

JP03/13416

PCT/JP03/13416

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

21.10.03
04 DEC 2003
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 6月13日

出願番号
Application Number: 特願2003-170091
[ST. 10/C]: [JP2003-170091]

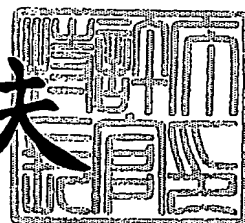
出願人
Applicant(s): 株式会社 エフェクター細胞研究所
松島 綱治

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3096429

【書類名】 特許願

【整理番号】 SP0065SSK

【提出日】 平成15年 6月13日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/00
C07K 14/00

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県松戸市松戸 159-1 第3住宅2-905

【氏名】 松島綱治

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区小石川 2丁目 9-12-201

【氏名】 米山博之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区後楽 1丁目 5-3 後楽寮 209号室

【氏名】 張 雁云

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区枳形 1丁目 21-2-503

【氏名】 金ヶ崎 士朗

【発明者】

【住所又は居所】 熊本市東町 4丁目 8番 10-104号 国家公務員南住宅

【氏名】 芥 照夫

【特許出願人】

【識別番号】 500201406

【氏名又は名称】 株式会社エフェクター細胞研究所

【特許出願人】

【識別番号】 502060843

【氏名又は名称】 松島綱治

【代理人】

【識別番号】 100082739

【弁理士】

【氏名又は名称】 成瀬 勝夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100083080

【弁理士】

【氏名又は名称】 平田 克文

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-310090

【出願日】 平成14年10月24日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011970

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0202868

【包括委任状番号】 0202873

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 2】 レセプター CCR1 又は CCR5 に対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 3】 アゴニストが MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3 及び MCP-4 から選ばれる請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 4】 アゴニストが MIP-1 α 、RANTES、MARC 及び LCC-1(ref) から選ばれる請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 5】 アゴニスト又はその機能的誘導体が MIP-1 α 又はその機能的誘導体である請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 6】 MIP-1 α の機能的誘導体が BB-10010 である請求項 5 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 7】 アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストである請求項 1 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 8】 アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたレセプター CCR1 又は CCR5 に対するアゴニストである請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 9】 アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3 又は MCP-4 である請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 10】 アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 α 、BB-10010、RANTES、MARC 又は LCC-1(ref) である請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 11】 アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 α 又は BB-10010 である請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上

昇剤

【請求項12】 アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたBB-10010である請求項2記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項13】 両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体である請求項7乃至12記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項14】 両親媒性高分子で化学修飾された未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニスト

【請求項15】 両親媒性高分子で化学修飾されたレセプターCCR1又はCCR5に対するアゴニスト

【請求項16】 両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 α 、BB-10010、MIP-1 β 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3又はMCP-4又はである請求項15記載のアゴニスト

【請求項17】 両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 α である請求項15記載のアゴニスト

【請求項18】 両親媒性高分子で化学修飾されたBB-10010である請求項15記載のアゴニスト

【請求項19】 両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体又はポリエチレングリコール誘導体である請求項14乃至18記載のアゴニスト

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、樹状細胞の血中レベル上昇剤及び該作用を有する両親媒性高分子で化学修飾された新規なアゴニスト誘導体に関する。

【0002】**【従来の技術】**

樹状細胞(dendritic cells; DCと略記する場合がある)は、幹細胞であるCD34⁺細胞から分化し、樹枝状の突起を持つという形態的特徴を有し、生体内において広く分布しており、生体内trafficking能力(移動能力)により、抗原の摂取とT

細胞への抗原提示を効率よく行う細胞であることが知られている。即ち、樹状細胞は、他の免疫担当細胞と同様に骨髄幹細胞に由来し、増殖分化・成熟の過程で分布する組織や器官を変えつつ、免疫監視細胞としての役割を果たしている細胞である。

【0003】

樹状細胞の増殖分化・成熟の過程は次の5段階に分けることができる。即ち、(1) 祖細胞期(DC progenitor)：主に骨髄に存在し、自己複製しながら前駆細胞を産生する。(2) 前駆細胞期(DC precursor)：定常状態で骨髄から血行性に生体の臓器にコンスタントに供給され、各臓器の血管壁を越えて組織内に入り上皮内や間質に分布する。(3) 見張り番期(sentinel DC)：樹状細胞はこのステージでは貪食能を持ち、分布した各臓器内に侵入してくる抗原を摂取する。表皮のLangerhans細胞、気道上皮の樹状細胞、心・肝など実質臓器のinterstitial DCなどがこの代表である。(4) 抗原輸送期(antigen-transporting DC)：樹状細胞は抗原情報を取り込むことにより一段階成熟して遊走能を獲得する。ヒト扁桃の場合は樹状細胞は陰窩上皮からT細胞領域(濾胞間域)まで扁桃組織内を遊走し、そこで免疫応答を起こす。他の臓器では、樹状細胞の多くは輸入リンパ管に入り、リンパ行性に所属リンパ節へ遊走し、T細胞領域(傍皮質)へ集積する。(5) 抗原提示期(mature DC)：リンパ臓器に入った樹状細胞は最終段階にまで成熟する。そして、T細胞と細胞集塊(クラスター)を形成して抗原特異的T細胞を選び出し、抗原提示を行う。その後、樹状細胞はT細胞領域でアポトーシスにより一生を終えるといわれる(医学の歩み Vol. 200, No.6, 472-476 (2002)参照)。

【0004】

末梢血から採取した樹状細胞(前駆体)を、in vitro で、例えばGM-CSF及びTNF α の存在下に増殖させた後、疾患抗原、例えば腫瘍細胞等の疾患抗原で刺激し、これを生体内に戻すことにより、疾患に対する免疫療法が増強されることが知られている。これは、樹状細胞による免疫療法、或いはワクチン療法と云われ、対象疾患としては、メラノーマ、腎ガン、前立腺ガン、白血病、転移性悪性腫瘍等多岐にわたり試みられている。この様に樹状細胞の治療への応用は広

く注目されており、樹状細胞を使った免疫療法は腫瘍のみならず、感染、移植や自己免疫の領域にも広がろうとしている(例えば、稲葉カヨ、細胞工学 Vol.19, No.9, 1282-1286(2000), 河本 宏他、細胞工学 Vol.19, No.9, 1289-1293(2000), 伊豫田智典他、細胞工学 Vol.19, No.9, 1311-1317(2000), 高山卓也他、分子細胞治療 Vol.2, No.6, 53-56(2001)参照)。

【0005】

未熟樹状細胞において発現しているレセプターとして、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR11及びCXCR4が知られている。これ等のレセプターに対するリガンドとして、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、TARC、MDC、MIP-3 α 、MIP-3 β 、LARC、TECK、BLC、SDF-1、Exodus-1、Exodus-2 その他が知られている。中でも、CCR-1及びCCR-5に共通するリガンドとしてMIP-1 α 、RANTES、MARC及びLCC-1(ref)が知られている(例えば、中野英樹、細胞工学 Vol. 19, No.9, 1304-1310(2000)参照)。

【0006】

リガンド(アゴニスト)と同様の生物活性を有するリガンドの機能的誘導體も知られており、例えば、MIP-1 α については、MIP-1 α の26番目のAspをAlaに置換し、アミノ末端がSerより始まる69アミノ酸よりなるMIP-1 α 変異体(BB10010)が知られている。このMIP-1 α 変異体は著しく改善された抗凝集能を有すると共に野生型と同等の活性を有することが見出され、癌化学療法の副作用である血中の顆粒球減少症の改善について検討されている(E. Marshall et al., European Journal of Cancer, Vol. 34, No. 7, pp. 1023-1029(1998))。

【0007】

両親媒性高分子の一種である部分ブチルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体で化学的に修飾されたネオカルチノスタチンが制癌剤(一般名称：ジノスタチンスタマラマー)として既に知られている(特公平1-33119号)。これは、血中に投与されたとき、固形腫瘍にほぼ選択的に集積し、長時間にわたり腫瘍内に維持されるという、所謂、EPR効果を示すことが知られており、ガン特異的ターゲティング型の制癌剤として使用されている。また、両親媒性高分子で化学修飾されたペプチド性アゴニスト又はその機能的誘導體も知られている(

WO 01/83548)。更に、ポリエチレングリコールで修飾されたキサンチンオキシダーゼも腫瘍細胞に対してEPR効果を示すことが知られている(特開平11-060499号)。これらは、何れも、腫瘍細胞に対して直接的な攻撃性を有する物質を用いて抗腫瘍効果を達成するものであり、攻撃性物質を標的患部に選択的に集積させることにより、正常な細胞や組織への影響を少なくすることを目的としている。

【0008】

また、両親媒性高分子の一種であるポリエチレングリコール誘導体でタンパク質を修飾することにより、生体内クリアランスを遅延させ、或いは抗原性を低下させることは知られている(Yoshimoto et al., Jpn. J. Cancer Res., 77, 1264 (1986)、Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys., 7, 175(1984)、特開昭61-178926号公報、特開昭62-115280号公報、特再表W096/28475号公報、特表平10-513187号公報、特開平11-310600号公報、特表2000-517304号公報、)。更に、ポリエチレングリコールで修飾されたインターロイキン-1、インターロイキン-6、インターフェロン等が知られている(特開平5-117300号公報、特開平6-256394号公報、特開平9-25298号公報)。

【0009】

【非特許文献1】

医学の歩み Vol. 200, No.6, 472-476 (2002)

【非特許文献2】

稲葉カヨ、細胞工学 Vol.19, No.9, 1282-1286(2000)

【非特許文献3】

河本 宏他、細胞工学 Vol.19, No.9, 1289-1293(2000)

【非特許文献4】

伊豫田智典他、細胞工学 Vol.19, No.9, 1311-1317(2000)

【非特許文献5】

高山卓也他、分子細胞治療 Vol.2, No.6, 53-56(2001)

【非特許文献6】

中野英樹、細胞工学 Vol. 19, No.9, 1304-1310(2000)

【非特許文献 7】

E. Marshall et al., European Journal of Cancer, Vol. 34, No. 7, pp. 1023-1029(1998)

【非特許文献 8】

Yoshimoto et al., Jpn. J. Cancer Res., Vol.77, 1264(1986)

【非特許文献 9】

Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys., Vol.7, 175(1984)

【特許文献 1】

特公平 1-33119 号公報

【特許文献 2】

WO 01/83548号公報

【特許文献 3】

特開平11-060499号公報

【特許文献 4】

特開昭61-178926号公報

【特許文献 5】

特開昭62-115280号公報

【特許文献 6】

特再表W096/28475号公報

【特許文献 7】

特表平10-513187号公報

【特許文献 8】

特開平11-310600号公報

【特許文献 9】

特表2000-517304号公報

【特許文献10】

特開平5-117300号公報

【特許文献11】

特開平6-256394号公報

【特許文献12】

特開平9-25298号公報

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

上述の様に樹状細胞の治療への応用領域が拡大されつつあるが、樹状細胞前駆体は末梢血中に僅かしか存在しないために、治療に役立つだけの量を入力することは、in vitroでの増殖を行ってもなお困難である。従って、患者の末梢血における樹状細胞前駆体のレベルの上昇を図ることは、樹状細胞による治療を実用化させる上で重要な鍵を握っている。本発明はそのための技術的手段を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

先に、本発明者は、下記参考例1に示すように、マウスに *Propionibacterium acnes*（以下P. acnesと云う）の死菌を投与することにより、樹状細胞前駆体（F4/80抗原陰性、B220抗原陰性、CD11c抗原陽性細胞）が血液中に誘導されることを見出した。その後の研究により、この樹状細胞前駆体誘導作用は抗Macrophage inflammatory protein-1 α （MIP-1 α ）抗体により抑制されることを見出し、樹状細胞前駆体の誘導メカニズムにMIP-1 α 延いては未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストが関与しているとの推定をするに至り、更に研究を進め、生体外から上記アゴニスト、例えばMIP-1 α を投与することにより血中に存在する樹状細胞前駆体の濃度レベルが少なくとも数十倍のオーダーで上昇するという予想外の現象を発見し、本発明をなすに至った。なお、本件明細書の記述において、特段の断りがない限り、「樹状細胞」なる用語は、その様々な成熟段階にあるものの総称として用いられる。

【0012】

しかし、天然型のMIP-1 α の如きリガンドの多くは生理的条件下で凝集体を形成し沈殿し、活性の消失を生ずることがしばしば問題になっていた。この問題を解決するために、これ等リガンドの樹状細胞前駆体の血中濃度レベル上昇作用を

更に向上させると共に血中安定性の改善することを目的として更に研究を行った。

【0013】

即ち、本発明者等は、未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストの代表例としてのMIP-1 α 及びその機能的誘導体の一例であるBB10010に着目し、これ等リガンドの両親媒性高分子による化学修飾を試み、化学修飾したリガンドがその活性を阻害されることなく、寧ろ活性が向上することを見出し、新規なアゴニスト誘導体を発明するに至った。

【0014】

ここに、本発明は、(1)未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(2)レセプターCCR1又はCCR5に対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

【0015】

より具体的には、(3)アゴニストがMIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3及びMCP-4から選ばれる樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤、又は(4)アゴニストがMIP-1 α 、RANTES、MARC及びLCC-1(ref)から選ばれる樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(5)アゴニスト又はその機能的誘導体がMIP-1 α 又はその機能的誘導体である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(6)MIP-1 α の機能的誘導体がBB-10010である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

【0016】

更には、(7)アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストである樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(8)アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたレセプターCCR1又はCCR5に対するアゴニストである樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(9)アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 α 、BB-10010、MIP-1 β 、RANTES、M

ARC、LCC-1(ref)、MCP-3又はMCP-4である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(10)アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 α 、BB-10010、RANTES、MARC又はLCC-1(ref)である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(11)アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 α 又はBB-10010である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(12)アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたBB-10010である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、また、(13)両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体である(7)乃至(12)の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

【0017】

本発明は、更に、(14)両親媒性高分子で化学修飾された未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストであり、(15)両親媒性高分子で化学修飾されたレセプターCCR1又はCCR5に対するアゴニストである。

【0018】

より具体的には、(16)両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 α 、BB-10010、MIP-1 β 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3又はMCP-4であり、(17)両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 α であり、(18)両親媒性高分子で化学修飾されたBB-10010であり、ここで(19)両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体又はポリエチレングリコール誘導体である(14)至(18)のアゴニストである。

【0019】

【発明の実施の形態】

MIP-1 α を用いた本発明者等の研究の結果から、未熟樹状細胞において発現しているレセプターであるCCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR11、CXCR4等に対するリガンド、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、TARC、MDC、MIP-3 α 、MIP-3 β 、LARC、TECK、BLC、SDF-1、Exodus-1、Exodus-2等について樹状細胞前駆体の血中濃度レベルを上昇させる作用があることが期待される。中でも、本発明者等の研究において樹状細胞の末梢臓器遊走に関係すると考えられるCCR-1及びCCR-5に共通するリガンドとして

知られているMIP-1 α 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)等が樹状細胞前駆体の血中濃度レベルを上昇させる作用において優れることが期待される。

【0020】

本発明における有効成分の代表例であるMIP-1 α はCCサブファミリーに属するケモカインとして知られており、レセプターCCR-1やCCR-5のリガンド(アゴニスト)である。ヒト成熟型MIP-1 α は70のアミノ酸よりなるとされているが、CD8⁺T細胞やHTLV-1感染細胞MT4培養上清から得られるものは66アミノ酸を有することが知られている。ヒトMIP-1 α には、個人により遺伝子コピー数の異なる非対立遺伝子LD78 β が存在し、70アミノ酸型MIP-1 α とは配列が3残基異なるものが知られている。これ等は何れも本発明において使用できる。

【0021】

本発明で使用できるアゴニストの機能的誘導体とは、未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するリガンドの誘導体であって、アゴニストとしての作用を有する物質を云う。例えば、MIP-1 α の機能的誘導体とは、MIP-1 α の誘導体であって、アゴニストとしてMIP-1 α と同様の生物活性を示すものであり、かかる生物学的同等物の代表例としてBB-10010(既出、European Journal of Cancer, Vol. 14, No. 7, pp. 1023-1029(1998))を挙げることができる。

【0022】

本発明において樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤として使用されるアゴニストは部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体やポリエチレングリコール誘導体で代表される両親媒性高分子で化学的に修飾すると、その活性が維持されると共に、血中安定性が改善されレベル上昇作用が持続すること及びEPR効果によるガン局所への集積が行われることが確認された。アゴニストのガン局所への集積は末梢血中で増加した樹状細胞のガン局所への集積をもたらすことになり、癌の免疫療法における効果を一層高めることになる。かくして、本発明で使用されるアゴニストの機能的誘導体は両親媒性高分子で化学的に修飾されることが好ましく、この様に両親媒性高分子で化学的に修飾されたアゴニスト及びその生物学的同等物も、本明細書において「アゴニストの機能的誘導体」と呼ぶことにする。

【0023】

本発明においてペプチド性アゴニスト又はその生物学的同等物を化学修飾するために用いられる両親媒性高分子の好ましい例として、部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体を挙げることができ、更に、そのアルキル部分の例としては、直鎖または分枝していてもよい炭素数が1乃至5であるアルキル基を挙げる事ができ、これ等アルキル基は低級アルコキシ基で置換されていても良い。より具体的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*s*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、2,3-ジメチル-1-プロピル、2-ペンチル、3-メチル-2-ブチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、メチルセロソルブ、エチルセロソルブ等を挙げる事ができる。

【0024】

好ましい部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体の例は、特公平1-33119号に記載されている、部分ブチルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体であって、平均分子量が1000~10000で、重合度が1乃至100、好ましくは3乃至35のものが選ばれる。

【0025】

本発明においてアゴニスト又はその生物学的同等物を化学修飾するために用いられる両親媒性高分子の好ましい他の例として、ポリエチレングリコール(以下PEGと記す場合もある)の誘導体を挙げる事ができる。ここで、ポリエチレングリコール誘導体とは、 $-O-(CH_2CH_2O)_n-$ で表されるPEG部分(*n*は20乃至280の整数)がアゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド鎖と結合し得る残基を有する化合物を意味する。ポリエチレングリコール誘導体の例としては、ペプチド鎖のアミノ基(N末アミノ基、リジン残基のアミノ基)に結合できる残基を有するものを挙げる事ができる。ポリエチレングリコール誘導体の他の例として、ペプチド鎖のカルボキシル基(C末カルボキシル基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基のカルボキシル基)に結合できる残基を有するものを挙げる事ができる。

【0026】

更に、本発明において用いられる両親媒性高分子の他の例として、ポリビニルピロリドンその他を挙げることができる。

【0027】

本発明に関わる両親媒性高分子で化学修飾されたアゴニスト及びその生物学的同等物は、両親媒性高分子とアゴニスト及びその生物学的同等物を、場合によりリンカーアームを介して化学結合させ、部分精製することにより得ることができる。即ち、両親媒性高分子とアゴニスト及びその生物学的同等物とを緩衝液中で反応させ、その後カラムクロマトグラフィを用いて精製し、溶出する各フラクションを分離する。

【0028】

両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体である場合を例にとり、より具体的に説明すれば、まず、スチレンと無水マレイン酸のラジカル共重合により得られるスチレン-マレイン酸共重合体 (SMA) の酸無水物をクメン等の有機溶媒に溶解させ、この溶液に n-ブタノールを攪拌下に滴下して反応させ、部分的に無水環をブチルエステル化することで、部分ブチルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体 (Bu-SMA) を得ることができる。かくして得られる Bu-SMA とアゴニスト又はその生物学的同等物との結合は、両者を pH 8.5 の重炭酸水素ナトリウム 0.3M 溶液中で反応させ、Bu-SMA 中の酸無水環とアゴニスト又はその生物学的同等物中のアミノ基との間にアミド結合を形成させることにより行なうことができる。アゴニスト又はその生物学的同等物に対する Bu-SMA の結合数は 1 以上であればよく、好ましくは 3 乃至 10、より好ましくは 6 乃至 8 である。

【0029】

両親媒性高分子として PEG を用いて、アゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド鎖のアミノ基を修飾する場合は、PEG の端末に、アミノ基と反応し得る官能基、例えば、カルボキシル基を導入することが好ましい。アゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド中のアミノ基に結合させるためには、該官能基を反応性基に変換することが好ましく、カルボキシル基の場合は、活性エステル法、混合酸無水物法等が好ましい例である。

【0030】

具体的には、活性エステルの場合、p-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル等のフェニルエステル類、N-ヒドロキシフタルイミドエステル、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル等のジカルボン酸イミドエステル、N-ヒドロキシピペリジンエステル等のヒドロキシル系活性エステル等が挙げられる。これ等の活性エステルの調製は、常法に従って行うことができ、例えば、PEG誘導体のカルボキシル基と上記の活性エステルに対応するアルコール体とをジシクロヘキシルカルボジイミドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等の縮合剤を用いて-20℃乃至室温にて1乃至24時間反応させることにより行うことができる。或いは、PEG誘導体のカルボキシル基と上記活性エステルに対応するハロゲン化物とを、トリエチルアミン等の塩基の存在下に、0℃乃至80℃で1乃至72時間反応させることによっても調製することができる。混合酸無水物法の場合は、N-メチルモルホリン、N-エチルピペリジン等の塩基の存在下に、イソブチルクロロホルメート、エチルクロロホルメート、塩化イソバレリル等と-20℃乃至0℃で1乃至30分間反応させることにより調製することができる。

【0031】

PEG誘導体をアゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド鎖に直接導入することもできるが、リンカーアームを介して導入することもできる。例えば、リジンを含む短いアミノ酸配列を目的とするペプチド鎖に導入し、そのリジンのアミノ基をPEG誘導体で修飾する。修飾反応においては、修飾されるペプチド鎖に含まれるアミノ基数に対して10乃至30倍モルのPEG誘導体を用いることが好ましい。

【0032】

両親媒性高分子としてPEGを用いて、アゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド鎖のカルボキシル基を修飾する場合は、PEGの末端に、カルボキシル基と反応し得る官能基、例えば、アミノ基を導入することが好ましい。

【0033】

かくして得られる両親媒性高分子で化学修飾されたペプチド性アゴニスト又は

その生物学的同等物は、所謂、EPR効果により固形腫瘍等の標的患部へと選択的に集積することが期待される。

【0034】

本発明に関わる樹状細胞の血中レベル上昇剤は、有効成分であるアゴニスト又はその機能的誘導体、即ちタンパク質を非経口的に投与するのが好ましく、例えば、水、若しくはそれ以外の薬学的に許容し得る液体との無菌性溶液又は懸濁液などの注射剤の形で投与されることが好ましい。注射の為の無菌組成物は注射用水のようなビヒクル、天然植物油などを用いて有効成分を溶解又は懸濁させるなどの通常の製剤手段に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、ヤシ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。

【0035】

本発明で得られるBu-SMAが結合したアゴニスト又はその生物学的同等物は、水溶性または油性注射剤の形で用いることができる。水溶性注射剤は主に静脈内投与に使用される。油性注射剤は、例えば、リピドールなどの油剤に均一に分散させたBu-SMAが結合したアゴニスト又はその生物学的同等物を腫瘍栄養動脈上流に固定したカテーテルにより腫瘍組織等の標的患部に投与される。Bu-SMAが結合したアゴニスト又はその生物学的同等物が血中でアルブミンと結合して高分子化合物として挙動すること及びBu-SMA結合物が油剤に可溶となることが本発明者等により見出されており、その結果、油剤化されたBu-SMA結合アゴニスト又は

その生物学的同等物を局所動脈に注射すれば、所謂、EPR効果により固形腫瘍等の標的患部へと選択的に集積することが期待される。

【0036】

このようにして得られる製剤は、例えば、ヒトまたは哺乳動物に対して投与することができる。本発明の有効成分の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、非経口的に投与する場合の該有効成分の1回投与量は、例えば、成人（体重60kgとして）に投与する場合、一回につき約0.01～10mg程度、好ましくは約0.1～5mg程度である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0037】

【参考例1】 *P. acnes*による血中への樹状細胞前駆体の誘導と抗MIP-1 α 抗体による誘導抑制

B6マウス（雌、8-10週齢、クレア社製）に*P. acnes*（1mg/匹；American Type Culture Collection 118289）を尾静脈より投与して、血中に樹状細胞前駆体を誘導した。*P. acnes*投与の6時間前に、その内の一群に機能抑制活性を有する抗MIP-1 α 抗体（ヤギポリクローナル抗体；100 μ g/ μ l；Genzyme/Techne社製）を尾静注した。陰性対照としてヤギIgG（Sigma-Aldrich社製）を同様にして投与した。

【0038】

*P. acnes*投与の3日後に各マウスより採取したヘパリン採血液をナイコプレップ（Axis-Shield社製）で分離して末梢血単核球を採取した。該末梢血単核球をFITC標識抗CD11c抗体（クローンHL3；ファーミンジェン社製）およびPE（フィコエリスリン）標識抗B220抗体（クローンRA3-6B2；ファーミンジェン社製）で4℃で反応させた後、フローサイトメーター（EPICS-Elite、コールター社製）によって解析した。B220抗原陰性、CD11c抗原陽性細胞を樹状細胞前駆体として、末梢血単核球における樹状細胞前駆体の割合を算出した。結果を図1に示す。図1において「PBS」は、対照としてPBSのみを投与した群の結果である。

【0039】

*P. acnes*投与により、非投与群に比べ末梢血単核球における樹状細胞前駆体の

割合が劇的に上昇した。このことは血液中に樹状細胞前駆体が誘導されたことを示している。抗MIP-1 α 抗体の投与群では、*P. acnes* 投与による末梢血単核球における樹状細胞前駆体の出現頻度の上昇が、約半分に抑制されることが確認された。

【0040】

【参考例2】MIP-1 α の製法

ヒトMIP-1 α 遺伝子をPCR法により取得した。該ヒトMIP-1 α 遺伝子を発現シャトルベクターpNCM02に組み込み、大腸菌にて増幅した。該ヒトMIP-1 α 遺伝子発現ベクターを*Brevibacillus choshinensis* (*B. choshinensis*) HPD31S5 に導入した。該ヒトMIP-1 α 遺伝子導入*B. choshinensis*を培養して、その上清を採取した。該培養上清に40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、沈殿生成後、遠心にて上清を分離して、さらに60%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、沈殿生成後遠心にて該沈殿物を回収した。該沈殿物をトリス塩酸バッファー (pH 8.0) に溶解し、該溶解物を陰イオン交換クロマトグラフィー (Q Sepharose; アマーシャム社製) にかけて分画した。各画分のうちMIP-1 α を含む画分を集め、硫酸アンモニウムを加えて溶解した (終濃度1.5M)。該溶解物を疎水性クロマトグラフィー (RESOURCE PHE; アマーシャム社製) にかけて分画した。各画分のうちMIP-1 α を含む画分 (非吸着画分) を集め、硫酸アンモニウムを加えて硫酸沈殿を行った (終濃度60%飽和)。沈殿物をトリス塩酸バッファー (pH 8.0) に溶解し、該溶解物を再度陰イオン交換クロマトグラフィー (RESOURCE Q; アマーシャム社製) にかけて分画した。各画分のうちMIP-1 α を含む画分を集め、トリス塩を除く目的で20mM NH₄HCO₃ (pH 8.5) に対して透析を行った。この処理により生じた沈殿を遠心することにより精製ヒトMIP-1 α を得た。これを凍結乾燥後PBSに溶解させ、以下の実験に用いた。

【0041】

【参考例3】BB10010の製法 (発現と精製)

BB10010のcDNAは、ヒトMIP-1 α cDNAをテンプレートとしQuik Change Kit (Stratagene社)を用いて、部位特異的変異により調製した。すなわち、125ngの変異プライマーRQ1:5'-CCAGCGAAGCCGGCAGGTCTGTGCTGACCCAG-3' (配列番号1)、RQ2:5'

-CTGGGGTCAGCACAGACCTGCCGGCTTCGCTTGG -3' (配列番号 2)、テンプレートプラスミド DNA 10ng に 50 μ M dNTP を含む 50 μ l の反応系に Pfu-turbo (2.5U/ μ l) 1 μ l 添加し、95 $^{\circ}$ C 30 秒の変性に続き、95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 1 分、68 $^{\circ}$ C 7 分を 12 サイクルおこなった後、反応系に制限酵素 DpnI を 1 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応することによりテンプレート DNA を切断することにより、変異プラスミドのみを回収した。変異部位が正しく置換されたことを DNA 配列解析により確認した後、MIPM2 プライマー 5'-CATGCCATGGCTTTCGCTTCACTTGCTGCTGACAC (配列番号 3) および MIPRV プライマー 5'-CGCGGATCCTCAGGCACTCAGCTCTAG (配列番号 4) を用いて通常の PCR を行い、制限酵素 NcoI 及び BamHI で切断後、バチルスプレビス発現ベクター pNCM02 の制限酵素サイトを挿入した。これを *Brevibacillus chonshinensis* HPD31 株を形質転換し、30 $^{\circ}$ C、3 日間、TMN 培地でジャーファーメンターにて 20L 培養し、分泌発現させた。この培地上清を 0.45 μ m のフィルターにてろ過除菌し精製の出発材料とした。この培地上清に 10 倍濃度のリン酸緩衝液 (0.1M Na-phosphate) を添加し、最終 pH 7.0 とし、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したヘパリンカラム (5ml サイズ、アマシャムバイオサイエンス社) に、AKTA-prime システム (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて 5ml/min で送液し BB10010 を吸着させた。溶出は 1M 塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (pH 6.5) をグラジエントで添加し行った。BB10010 溶出画分は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて確認した。ピーク画分は、50mM ギ酸緩衝液 (pH 4.0) に対して透析した。続いて陽イオン交換クロマト SP-FF (1ml サイズ、アマシャムバイオサイエンス社) に 1ml/min で送液し、BB10010 を吸着させた。溶出は 1M 塩化ナトリウムを含むギ酸緩衝液 (pH 3.8) をグラジエントで添加し行った。BB10010 溶出画分は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて確認した。ピーク画分は、ゲルろ過クロマトグラフィー (充填剤: バイオラッド社製 Bio-GelP60、移動相: 20mM 重炭酸水素アンモニウム溶液 (pH 8.5)、カラムサイズ: 1.6 \times 83cm) に付して BB10010 を精製した。そのピーク画分を凍結乾燥した。

【0042】

【実施例 1】 MIP-1 α のマウス血中への樹状細胞前駆体誘導活性

B6 マウス (雌、8-10 週齢、クレア社製) に参考例 2 の製法により得られた精製 M

IP-1 α (5 μ g/匹) を尾静脈より投与して、血中に樹状細胞前駆体を誘導した。MIP-1 α 投与の4, 8, 16, 24, 48, 72時間後に該マウスより採取したヘパリン採血液を参考例1と同様にフローサイトメーターによって解析して、末梢血単核球における樹状細胞前駆体の割合を算出した。

【0043】

結果を図2に示す。図において□の折れ線グラフが示すように、MIP-1 α 投与により、短時間のうちに末梢血単核球における樹状細胞前駆体(B220-CD11c+cells)の割合が劇的に上昇し、投与後8時間でピークに達し(12.45% \pm 0.49)、該ピークは24時間後まで持続した。MIP-1 α 投与前(図2の時間がゼロの時点)における樹状細胞前駆体の濃度が0.5乃至1%であったことから、12乃至24倍のオーダーで血中レベルが上昇したことが明らかである。

【0044】

更に、図2において◇の折れ線グラフが示すように、MIP-1 α 投与により、末梢血単核球における樹状細胞前駆体(B220+CD11c+cells)の割合が上昇し、投与後8時間でピークに達し、該ピークは24時間後まで持続した。最近における本発明者等の研究によれば、プラズマ細胞系の樹状細胞前駆体であるB220+CD11c+cellsは、炎症リンパ節における高内皮性細静脈(high endothelial venules)にEセレクトイン及びCXCL9に依存して直接結合すると共に遊出し、骨髓性樹状細胞であるB220-CD11c+cellsの機能をサポートすることが確認されている。また、B220+CD11c+cellsはインターフェロン γ を産生しキラー細胞の活性化を促すことも本発明者等により明らかにされている。これ等の諸知見から、末梢血におけるB220+CD11c+cellsのレベル上昇は樹状細胞による免疫療法において重要な意味をもたらすものである。

【0045】

【実施例2】 MIP-1 α によってマウス血中へ誘導された樹状細胞前駆体の機能解析

MIP-1 α によってマウス血中へ誘導された樹状細胞前駆体がP. acnes により誘導された樹状細胞前駆体と同様の性状を有するかを解析する目的で以下の実験を行った。

【0046】

<1>末梢血由来樹状細胞前駆体の調整

B6マウス（雌、8-10週齢、クレア社製）にP.acnes死菌（1 mg/匹）又は参考例2の製法で得られた精製MIP-1 α （5 μ g/匹）を尾静脈より投与した。P.acnes死菌投与後3日目あるいはMIP-1 α 投与後16時間目に該マウスより麻酔下にて心臓からヘパリン採血を行った（0.8 ml/匹）。該ヘパリン採血液をナイコプレップで分離して末梢血単核球を採取した。該末梢血単核球をFITC標識抗CD11c抗体およびPE標識抗B220抗体で4℃で30分反応させた後、セルソーター（EPICS-Elite、コールター社製）によりB220抗原陰性、CD11c抗原陽性細胞を分離した。該分離細胞をGM-CSF（4 ng/ml; Kirin Brewery社製）とIL-4（10 ng/ml; Genzyme/Tech社製）存在下で5日間培養したものを末梢血由来樹状細胞前駆体とした。

【0047】

<2>骨髄由来樹状細胞前駆体の調整

B6マウスの大腿骨および脛骨より骨髄細胞を採取した。該骨髄細胞をナイコプレップで分離して骨髄単核球を採取した。該骨髄単核球をシャーレで10-12時間培養し、非付着骨髄単核球を回収した。該非付着骨髄単核球を磁気ビーズ標識c-kit抗体と混合培養し、磁気細胞ソーター（MACS; MiltenyiBiotec社製）にてc-kit陽性細胞を分離した。該c-kit陽性細胞を2.5 x 10⁵ cells/mlの濃度にて、SCF（須藤先生（Toray社）より供与）、Flt3L（Immunex社製）、GM-CSF（4 ng/ml）とIL-4（10 ng/ml）存在下で7-9日間培養したものを骨髄由来樹状細胞前駆体とした。該c-kit陽性細胞を2.5 x 10⁵ cells/mlの濃度にて、SCF（須藤先生（Toray社）より供与）、Flt3L（Immunex社製）、GM-CSF（4 ng/ml）とIL-4（10 ng/ml）存在下で7-9日間培養したものを骨髄由来樹状細胞前駆体とした。

【0048】

<3>樹状細胞前駆体の抗原感作

抗原となる癌細胞株の可溶化物は、癌細胞を凍結・溶解を3回繰り返すことにより調製した。該末梢血由来樹状細胞前駆体（P.acnes死菌あるいは精製MIP-1 α 投与マウス由来）および該骨髄由来樹状細胞前駆体と該癌細胞株可溶化物を樹状細胞前駆体：癌細胞が1：3になるように混合し、20時間培養した。該癌細胞株

可溶化物感作樹状細胞前駆体を回収し、マイトマイシンC (10 μ g/ml) にて処理を行った後、2回洗浄したものを抗原感作樹状細胞前駆体とした。

【0049】

< 4 > 抗原感作樹状細胞前駆体によるTリンパ球増殖反応測定

B6マウス脾臓細胞より、磁気細胞ソーター (MACS; MiltenyiBiotec社製) を用いてCD3陽性Tリンパ球を調製した。該Tリンパ球と該抗原感作樹状細胞前駆体 (B16癌細胞株可溶化物で感作した骨髓由来樹状細胞前駆体) の比が1:20になるように混合し、IL-2、IL-7の存在下で24穴プレートにて培養した。該培養Tリンパ球を5日間培養後、2-3日おきに50%の培地を新鮮なものと交換することにより培養を継続した。7および14日目に該抗原感作樹状細胞前駆体を新たに加えることにより、該培養Tリンパ球の再感作を行った。培養21日目に該培養Tリンパ球を回収した。次いで96穴丸底培養プレート (Nunc社製) を用いて、該培養Tリンパ球をMMC処理したB16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 α 投与マウス由来)、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髓由来樹状細胞前駆体、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみと混合し、37℃で4-5日間培養した。培養後、5 mg/ml のMMT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)溶液を15 μ l/穴加え、37℃で4時間培養した。培養後、各穴の550 nm の吸光度を測定することにより、該Tリンパ球の増殖を測定した。

【0050】

結果を図3に示す。B16癌細胞株可溶化物で感作した精製MIP-1 α 投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体は、P. acnes死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髓由来樹状細胞前駆体と同様に該培養Tリンパ球の増殖を増強した。一方、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみではこのような該培養Tリンパ球の増殖の増強活性は認められなかった。

【0051】

< 5 > マウスの腫瘍増殖における免疫の効果の検討

B6マウスのグループ (8匹/グループ) それぞれに、0日目、7日目の2回、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 α 投与マウス由来)、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髄由来樹状細胞前駆体、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体 (各1 x 10⁶/マウス)、癌細胞株可溶化物のみあるいはPBSを腹側の皮下に注入した。14日後に該マウスの腹側の皮下にB16 癌細胞 (2 x 10⁵/マウス) を接種した。接種後3日おきに、腫瘍の面積を測定し、腫瘍の増殖を判定した。同時にマウスの生存日数も観察した。

【0052】

結果を図4に示す。B6マウスをB16癌細胞株可溶化物で感作した精製MIP-1 α 投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体により免疫することにより、皮下に接種したB16癌細胞の増殖が著明に抑制された。また50% (5/10) のマウスにおいては、腫瘍の消失が観察され、60日以上生存の延長が確認された。この効果は、P. acnes死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髄由来樹状細胞前駆体と同等であった。一方、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみで免疫したマウスは、癌接種後20日以内に全例が死亡した。

【0053】

<6> 腫瘍特異的細胞傷害活性の測定

上記<4>と同様の方法により、B6マウス脾臓細胞よりCD3陽性Tリンパ球を調製し、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 α 投与マウス由来)、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髄由来樹状細胞前駆体、あるいは癌細胞株可溶化物のみと混合培養することにより培養Tリンパ球を調製した。96穴プレートに該培養Tリンパ球を連続希釈したものを100 μ l/穴ずつ加えた。次にB16 癌細胞株の細胞浮遊液を100 μ l/穴ずつ加えた。該プレートを37 $^{\circ}$ C、10時間培養した。該プレートを遠心後、上清100 μ l/穴を新たな96穴プレートに移した。各穴に Cytotoxicity Detection Kit (LDH; ベーリンガーマンハイム社製) の反応液を100 μ l/穴ずつ加えた。該反応プレートを室温で30分反応させた後、プレート吸光度測定装置にて 490 nm の吸光度を

測定した。

【0054】

結果を図5に示す。B16癌細胞株可溶化物で感作した精製MIP-1 α 投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体と混合培養したTリンパ球は、効率的にB16癌細胞を傷害したが、EL4癌細胞は傷害しなかった。B16癌細胞株可溶化物で感作したP. acnes死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髓由来樹状細胞前駆体で混合培養したTリンパ球も同様にB16癌細胞を傷害した。しかし一方、癌細胞株可溶化物のみと混合培養したTリンパ球は、B16癌細胞を傷害しなかった。

【0055】

<7>上記<5>において、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体（MIP-1 α 投与マウス由来）あるいは該骨髓由来樹状細胞前駆体で免疫したB6マウスのうち、B16癌細胞株接種後60日目に癌細胞が消失していたものについて、該マウスより脾臓細胞を採取した。該脾臓細胞のCD8陽性Tリンパ球を分離して（ 1×10^6 ）、MMC処理したB16癌細胞株（ 1×10^5 ）と5日間培養した。96穴プレートに該培養Tリンパ球を連続希釈したものを100 μ l/穴ずつ加えた。次にB16癌細胞株の細胞浮遊液を100 μ l/穴ずつ加えた。該プレートを37 $^{\circ}$ C、10時間培養した。該プレートを遠心後、上清100 μ l/穴を新たな96穴プレートに移した。各穴に Cytotoxicity Detection Kit (LDH; ベーリンガーマンハイム社製) の反応液を100 μ l/穴ずつ加えた。該反応プレートを室温で30分反応させた後、プレート吸光度測定装置にて 490 nm の吸光度を測定することにより細胞傷害活性を測定した。MHC classI 機能阻害実験の場合は、B16癌細胞を抗MHC classI抗体（抗 H2Kb/H2Db 抗体）あるいはコントロール抗体（抗 H2Dd 抗体）で添加前37 $^{\circ}$ C、30分間、処理した。

【0056】

図6に結果を示す。該培養Tリンパ球は、効率的にB16癌細胞を傷害したが、EL4癌細胞は傷害しなかった。またこの活性は、該培養Tリンパ球を抗MHC classI抗体で処理することにより完全に抑制された。しかしコントロール抗体では、このような効果はみられなかった。

【0057】

< 8 > B6マウスに、0日目、7日目の2回、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体（P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 α 投与マウス由来）、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髄由来樹状細胞前駆体、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体（各 1×10^6 /マウス）、癌細胞株可溶化物のみあるいはPBSを腹側の皮下に免疫した。二回目の免疫後7日目に、該免疫マウスより脾臓細胞を採取した。該脾臓細胞よりセルソーターを用いてCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞T細胞を分離した。該T細胞をMMC処理したB16癌細胞と混合し、24穴プレートを用いて48時間培養した。該培養細胞を用いて、細胞傷害活性を測定した。また該培養細胞の上清中のIFN γ 濃度をIFN γ ELISAシステム（エンドジェン社製）を用いて測定した。

【0058】

< 9 > 肺転移における効果の確認

B6マウスの尾静脈よりB16癌細胞（ 1×10^6 /マウス）を注入した。癌細胞注入後3日目、7日目に、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体（MIP-1 α 投与マウス由来）、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髄由来樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体（各 1×10^6 /マウス）、癌細胞株可溶化物のみあるいはPBSをそれぞれ尾静脈より注入した。癌細胞注入後21日目にマウス肺を摘出して、癌転移巣の数を測定して転移の程度を判定した。

【0059】

結果を図7に示す。データは、各グループ3匹のマウスの平均値で表している。B16癌細胞株可溶化物で感作した精製MIP-1 α 投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体および骨髄由来樹状細胞前駆体で癌接種後免疫を行ったマウスでは、B16癌細胞の肺への転移が劇的に抑制された。しかし混合培養したTリンパ球も同様にB16癌細胞を傷害した。しかし未感作該樹状細胞前駆体で免疫したマウスでは、このような転移抑制効果はみられなかった。

【0060】

【実施例3】 Bu-SMA結合BB10010の製法

参考例3で得られたBB10010を濃度が2mg/mlとなるように、0.8M重炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH8.5）に溶解させた。この溶液1mlに対し、ジエチルホルムア

ミドに溶解したBu-SMA 2.6mg(モル比にして、Bu-SMA:BB10010=10:1)を徐々に加え、一晚、27度で反応させた。反応終了後、反応混合物をゲルろ過クロマトグラフィー(充填剤:バイオラッド社製Bio-GelP60、移動相:20mM重炭酸水素アンモニウム溶液(pH8.5)、カラムサイズ:1.6×83cm)に付してBu-SMA結合BB10010を精製した。2mlごとに90本の試験管に分離した(図8)。次いで、280nmにおける吸光度に基づき、試験管番号16~18に溶出した画分(6ml)を凍結乾燥させて白色粉末状のBu-SMA結合BB10010(以下において、「Bu-SMA-BB10010」と表示する)を得た。

【0061】

得られたBu-SMA-BB10010および原料であるBB10010のNative-PAGE(未変性10-20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動)の結果を図9に示す。両者の泳動距離は、明らかに異なっている。これは、BB10010のリジンのアミノ基がSMAによって修飾されたことにより表面のプラスチャージが減少し、より陽極側に泳動されやすくなったためと考えられる。この両者の泳動距離の差およびフラクションNo.16~18のBu-SMA-BB10010と、未反応のBu-SMAおよびBB10010のアミノ基を蛍光試薬Fluorescamine(0.3mg/ml in acetone)と反応させ、分光蛍光計で、励起波長390nm、蛍光波長475nmで測定し、定量し、1分子に2~3個のSMAが結合しているの見積もられた。

【0062】

【実施例4】

健常人から80ml採血し、Polymorphprep(第一科学)と共に1600rpmで20℃、35分遠心し単核球層を分離した。リンパ球、好中球を除くため、プラスチック吸着法を利用した。すなわち、あらかじめ10%FCSを含むRPMI 1640(SIGMA)で37℃ 30分間コートした細胞培養ディッシュに単核球層を10%FCSを含むRPMI1640で 2×10^5 cells/cm²に調整し浮遊させ、37℃ CO₂分圧下で1時間置き単核球をディッシュに付着させた。培養液を除いた後、あらかじめ37℃に加温した1%FCSを含むRPMI1640で2回ディッシュを洗浄し、4℃ 1%FCSを含むRPMI1640を加え氷上に30分静置した。その後ピペティングにより単核球を回収し、単核球浮遊液を1600rpm 4℃遠心分離した。上清を除去した後、1%FCSを含むRPMI1640で 1×10^6 個/mlに調整した

。この50ulを46穴ケモタキシスチャンバー（家田貿易）の上室に置き、下室に走化性因子を置きCO₂分圧下に90分置いた。境界のメンブレンフィルターはポアサイズ5umを使用した。Diff Quick（国際試薬株式会社）I液 10秒、II液 10秒により染色し、顕微鏡下にて染色細胞をカウントした。その結果、Bu-SMA-BB10010を含有するフラクションは、その濃度に依存して単球走化性活性を示し、その活性は、未修飾BB10010の約100分の1の濃度で2倍以上の活性を示した。このことから、BB10010はBu-SMAで化学修飾されても生物活性を保持していること及びその活性が未修飾のものよりも高いことが確認された。

【0063】

【実施例5】

Bu-SMA-BB10010の血中への樹状細胞動因作用とBB10010との比較実験を次の如く行った。BALB/cマウス(9週令 雄：セアック吉富)の尾静脈より、Bu-SMA-BB10010（フラクションNo.16~18）200ug/ 200ul、または、未修飾BB10010を200ug/200ul投与し、24時間後に腸間膜静脈より静脈血を採取した。得られた単核球をPBS(-)+2%FCSに 5×10^5 cells / 50 μ lに調整し、FITC標識抗CD11c抗体(FITC CONJUGATED HAMSTER ANTIMOUSE CD11c:Pharmingen)およびPRE標識抗B220抗体(R-P E CONJUGATED RAT ANTIMOUSE 45R/B220:Pharmingen)をそれぞれ25倍、200倍に希釈し、氷上で1時間、遮光条件下で反応させた後、FACS(BECTON DICKINSON社製)にて表面抗原が蛍光標識された細胞数の割合を測定し、数値化した(図10)。その結果、単核球に占めるCD11c(+) B220(-)細胞群の割合は、対照群が $2.52 \pm 0.34\%$ のところ、Bu-SMA-BB10010投与群では、 $11.45 \pm 2.59\%$ であり、4.5倍に上昇し、未修飾BB10010投与群の $6.65 \pm 0.78\%$ と比較し1.7倍上昇しており、SMA修飾により血中安定性の増大等が影響し、血中への樹状細胞動因作用の増強効果が認められた。またCD11c(+)B220(+)細胞群の割合も、対照群 $1.19 \pm 0.13\%$ に対し、Bu-SMA-BB10010投与群では、 $5.14 \pm 2.12\%$ であり、4.3倍に上昇し、未修飾BB10010投与群の $2.12 \pm 0.69\%$ と比較し 2.4倍上昇しており、同様にこれら細胞群の血中への動因作用の増強が認められた。

【0064】

【発明の効果】

肝ではKupffer cellがMIP-1 α を産生すること、及びDC前駆細胞はそれに対応するレセプターCCR5を発現していることが報告されている(J. Exp. Med., 193:35-49(2001))。これらの事実に基づき、炎症が一度起これば、樹状細胞の前駆細胞が、免疫応答の必要性の有無に関わらず、好中球並みの速さで抗原の探査に駆けつけ、抗原が存在する場合は最短時間で免疫応答を惹起し、生体のリスクを減らすことになるとの推定がなされている(医学の歩み Vol. 200, No.6, 472-476 (2002))。

【0065】

また、末梢血中には樹状細胞に分化する幹細胞であるCD34⁺細胞が存在し、これがMIP-1 α により動員されることも報告されている。更に、CD34⁺細胞をin vitroで培養し増殖させるためにMIP-1 α を用い得ることが知られている(USP 5922597(1999))。

【0066】

しかし、生体外から投与したMIP-1 α がDC前駆細胞の血中への動員に直接的に寄与することは知られておらず、しかも、血中に存在する樹状細胞前駆細胞の濃度レベルが少なくとも数十倍のオーダーで上昇するという事は、本発明者等により初めて見出されたことである。

【0067】

更に、本発明により血中におけるレベルが上昇した樹状細胞前駆細胞が、生体内で十分なワクチン効果を奏することは実施例2において詳述した通りである。

【0068】

MIP-1 α の生物学的同等物を両親媒性高分子で化学的に修飾することにより、樹状細胞前駆細胞の動員活性効果が顕著に増加した。このことから、他のアゴニスト及びその生物学的同等物についても同様な効果が期待される。

【0069】

かくして本発明により、患者から十分な量の樹状細胞前駆細胞を採取することが可能となり、樹状細胞による免疫療法の実用化への道が拓かれたとすることができる。

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Effector Cell Institute

MATSUSHIMA Kouji

<120> Increasing of Dendritic Cell precursors in peripheral blood

<130> SP0065SSK

<140>

<141>

<150> JP 2002-310090

<151> 2002-10-24

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

CCAGCGAAGC CGGCAGGTCT GTGCTGACCC AG

32

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

CTGGGGTCAG CACAGACCTG CCGGCTTCGC TTGG

3

4

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens sequence bound to Brevibacillus choshinensis sequence

<400> 3

CATGCCATGG CTTTCGCTTC ACTTGCTGCT GACAC

35

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
CGCGGATCCT CAGGCACTCA GCTCTAG

27

【図面の簡単な説明】

【図 1】 B6マウスへのP. acnes 投与による末梢血への樹状細胞前駆体の誘導における、抗MIP-1 α 抗体の効果を示す。

【図 2】 B6マウスへのMIP-1 α 投与による末梢血への樹状細胞前駆体の誘導活性を経時的に示す。

【図 3】 MIP-1 α により誘導した樹状細胞前駆体を抗原感作したものとTリンパ球を共培養して行った混合リンパ球反応におけるTリンパ球の増殖の効果を示す。

【図 4】 マウスに接種した腫瘍細胞の増殖における、MIP-1 α により誘導した樹状細胞前駆体を用いたワクチン療法の効果を示す。

【図 5】 MIP-1 α により誘導した樹状細胞前駆体の in vitroでの腫瘍特異的な傷害T細胞の誘導における効果を示す。

【図 6】 MIP-1 α により誘導した樹状細胞前駆体によって誘導された腫瘍特異的な傷害T細胞のMHC classI 拘束性の確認実験の結果を示す。

【図 7】 MIP-1 α により誘導した樹状細胞前駆体を用いたワクチン療法の腫瘍細胞のマウス肺転移における効果を示す。

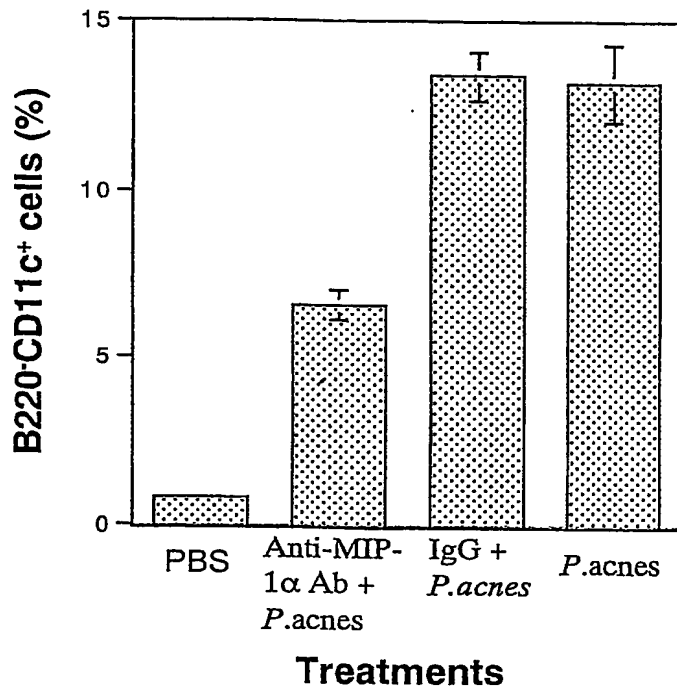
【図 8】 Bu-SMA-BB10010のフラクション毎の280nmにおける吸光度を示す。

【図 9】 Bu-SMA-BB10010および原料であるBB10010のNative-PAGE電気泳動の結果を示す。

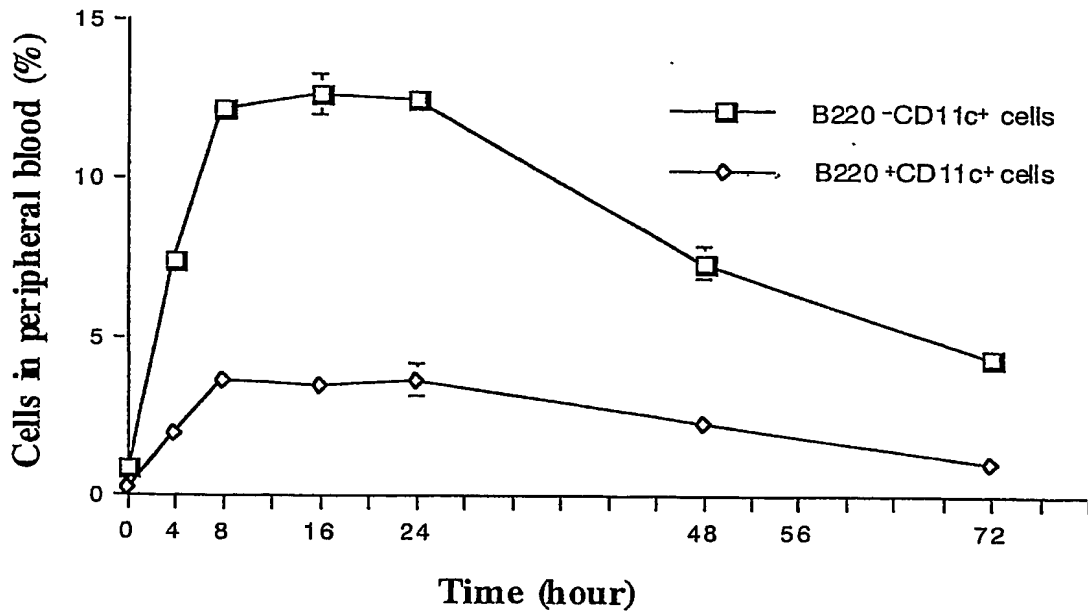
【図10】 BB10010及びBu-SMA-BB10010の静脈投与24時間後の血中樹状細胞占有率を示す。斜線の棒グラフはB220-CD11c+の場合を、斜線のない棒グラフはB220+CD11c+の場合を夫々示す。

【書類名】 図面

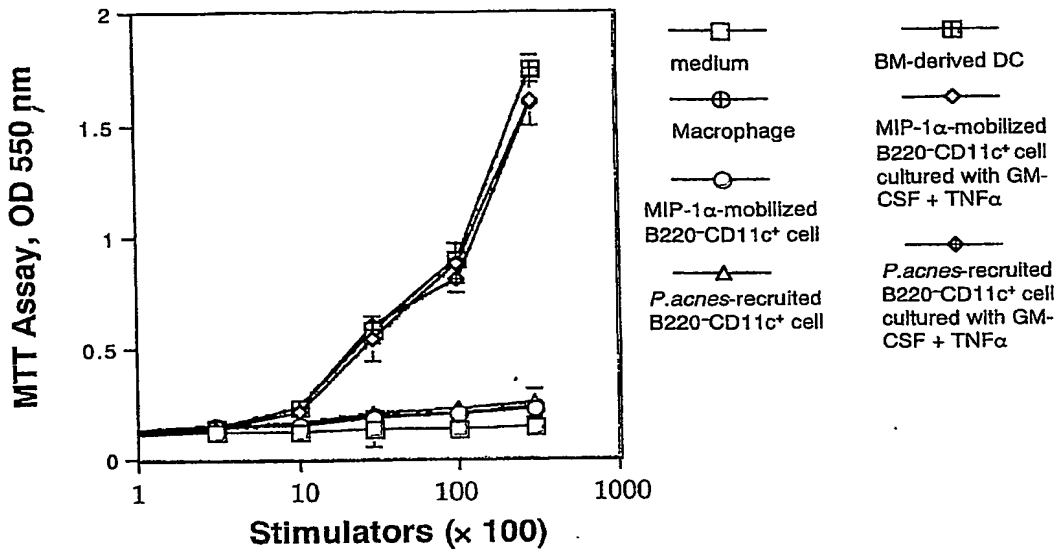
【図 1】



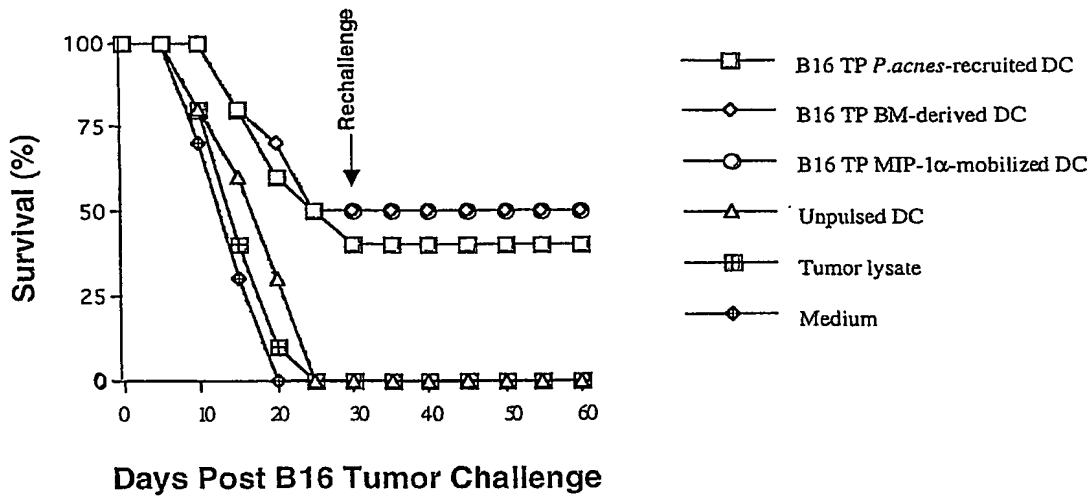
【図 2】



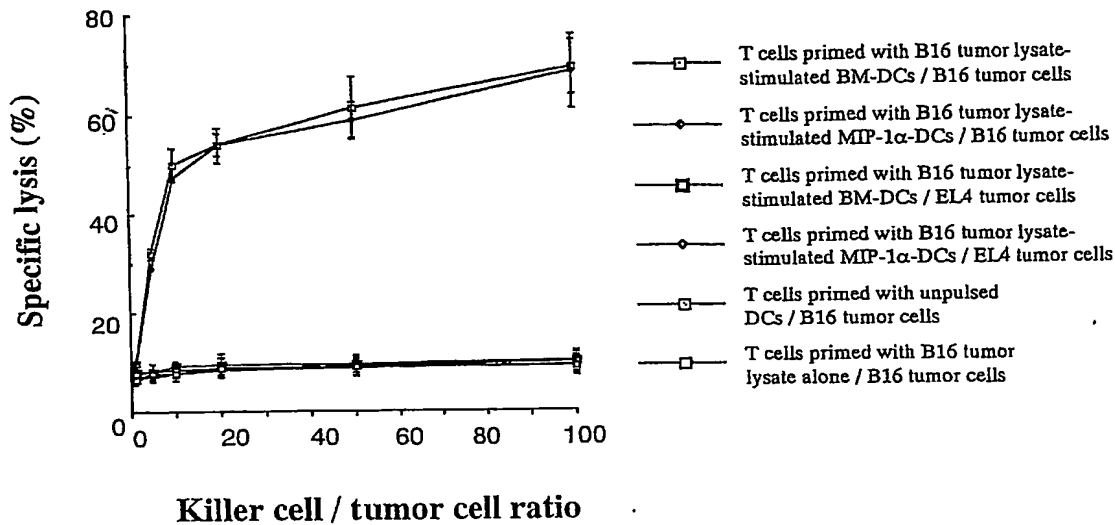
【図 3】



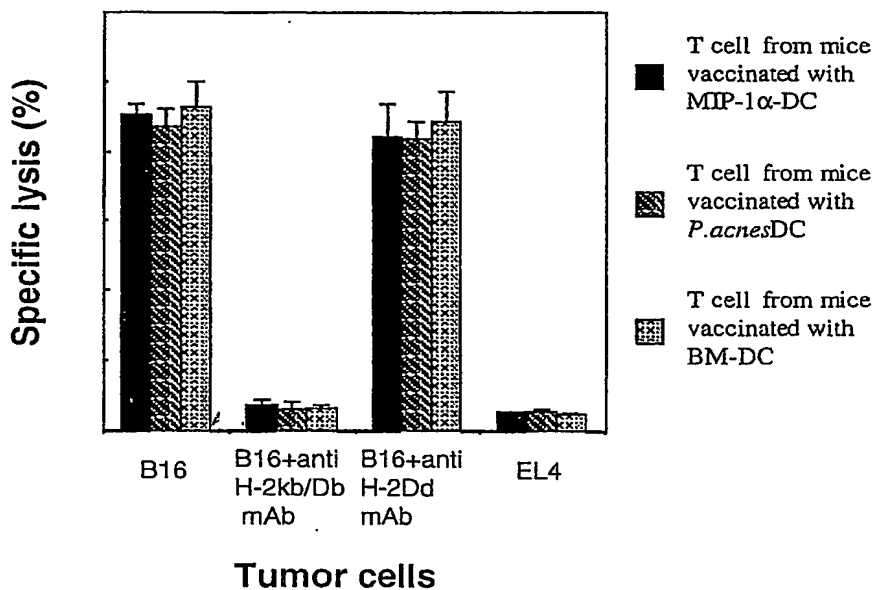
【図 4】



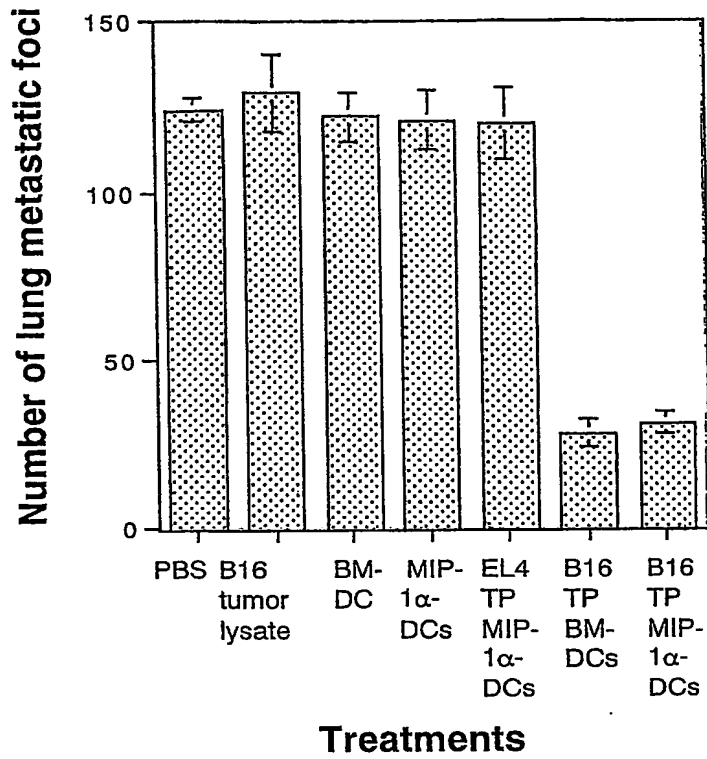
【図 5】



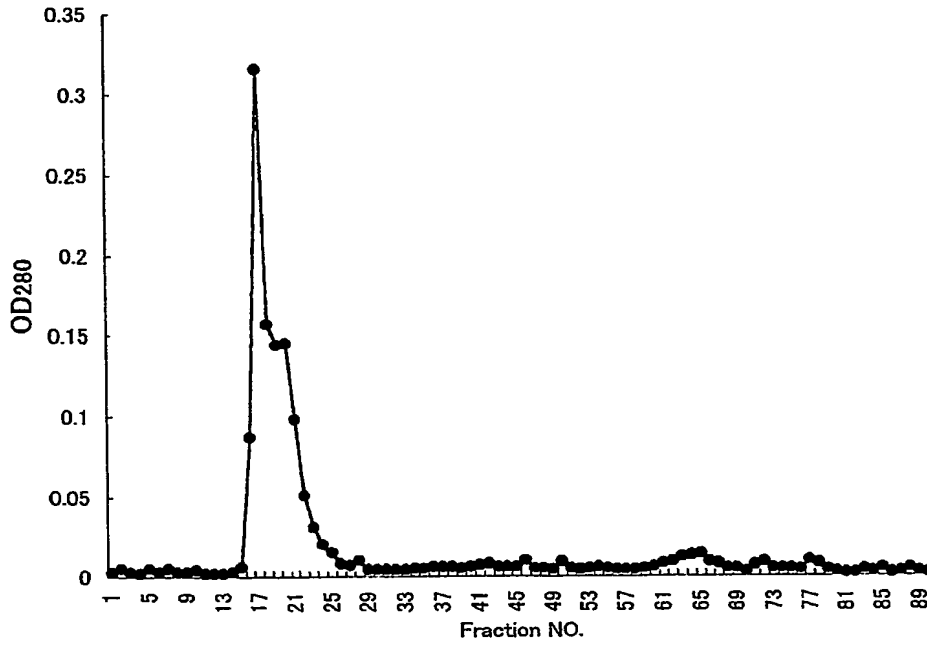
【図 6】



【図 7】



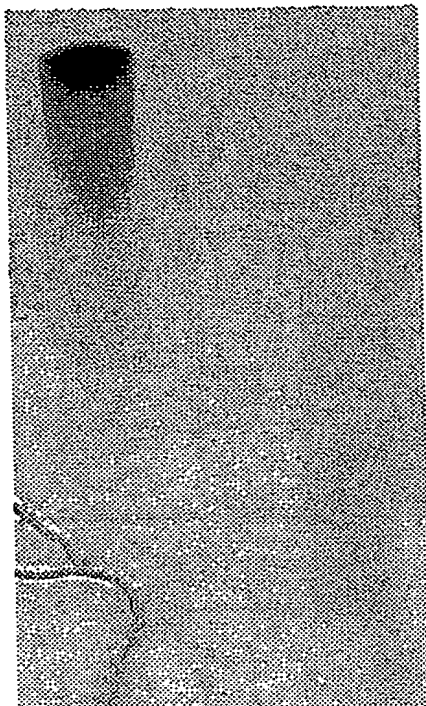
【図 8】



SMA-BB10010 の精製

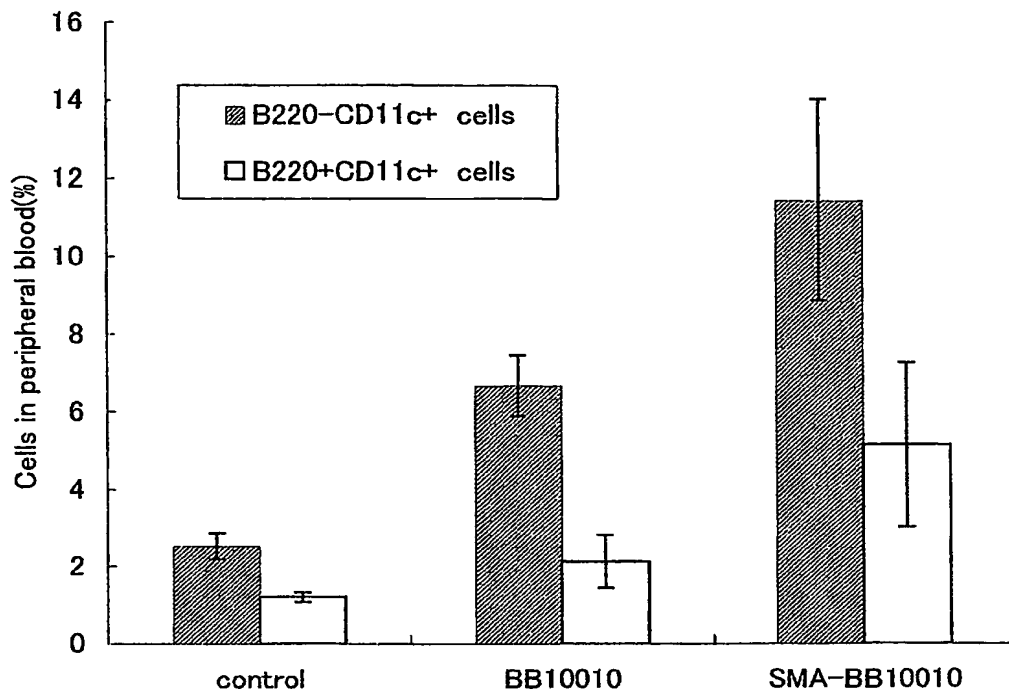
【図9】

BB10010 SMA-BB10010



SMA-BB10010 と未修飾 BB10010 の NativePAGE による解析

【図 10】



静脈投与 24 時間後の血中樹状細胞占有率

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 樹状細胞の治療への応用領域が拡大されつつあるが、樹状細胞前駆体は末梢血中に僅かしか存在しないために、治療に役立つだけの量入手することは、in vitroでの増殖を行ってもなお困難である。従って、患者の末梢血における樹状細胞前駆体のレベルの上昇を図ることは、樹状細胞による治療を実用化させる上で重要な鍵を握っている。

【解決手段】 本発明は、未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

【選択図】 図2

特願 2003-170091

出願人履歴情報

識別番号

[500201406]

1. 変更年月日

2000年 4月28日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都目黒区駒場4-6-2メゾン駒場401号

氏名

株式会社 エフェクター細胞研究所

特願2003-170091

出願人履歴情報

識別番号

[502060843]

1. 変更年月日

2002年 2月19日

[変更理由]

新規登録

住所

千葉県松戸市松戸159-1 第3住宅2-905

氏名

松島 綱治